4 月 April
2020, 63(4): 494 - 501

昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

http://www.insect.org.cn
doi: 10.16380/j.kcxb.2020.04.012

红火蚁巢穴土壤中生物碱成分分析

李晓玲[1,2], 陈 立[2,*], 方守国[1,*]

(1. 长江大学农学院, 湖北荆州 434025; 2. 中国科学院动物研究所, 农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室, 北京 100101)

摘要:【目的】红火蚁 *Solenopsis invicta* 栖息在真菌和细菌较丰富的土壤环境中,容易受多种真菌和细菌性病原体的侵染,因红火蚁的毒液具有很好的防御和抗菌作用,致使红火蚁能生存于此类土壤环境中。为了探索这一奥秘,本研究旨在建立红火蚁巢穴土壤中的毒液生物碱的最佳提取方法,并对毒液生物碱成分进行定量分析。【方法】采集蚁巢周边 3 m 处的土壤,进行添加、回收红火蚁毒液实验。采用抽滤法提取土壤中的毒液生物碱,利用 GC-FID 对毒液生物碱成分进行定量分析,筛选最佳的提取溶剂,并且确定添加三乙胺的最佳体积比。然后用最优方法提取蚁巢土壤中的毒液生物碱,并进行定量分析。【结果】正己烷、二氯甲烷、乙酸乙酯、丙酮和甲醇 5 种提取溶剂中,正己烷处理的生物碱回收率略优。当添加的三乙胺的体积为 1 mL 及以上时,提取效果最佳。红火蚁巢穴土壤中的毒液生物碱成分中,*trans*-C15:1的含量最高,*trans*-C13:1的含量次之。巢穴土壤中总生物碱含量约为 22 μg/g。【结论】三乙胺有助于提取蚂蚁巢穴土壤中的毒液生物碱。红火蚁巢穴土壤中的生物碱浓度较高,有可能对巢穴土壤微生物群落产生重要影响。

关键词: 红火蚁; 毒液; 巢穴土壤; 生物碱; 抽滤法; 回收率; GC-FID

中图分类号: Q968.1 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2020)04-0494-08

Analysis of alkaloid components in the soil from the nest of the red imported fire ant, *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae)

LI Xiao-Ling[1,2], CHEN Li[2,*], FANG Shou-Guo[1,*] (1. School of Agriculture, Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434025, China; 2. State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract:【Aim】The red imported fire ant, *Solenopsis invicta*, inhabits the soil environment rich in bacteria and fungi. Although they are vulnerable to infection of bacterial and fungal diseases, fire ants with defensive and antibacterial venom alkaloids can survive in such soil environment. This study aims to establish an optimal extraction method of alkaloids from the soil of the red imported fire ant nest and then to quantify the major components of venom alkaloids.【Methods】In the recovery experiment, *S. invicta* venom was added to soil obtained 3 m away from *S. invicta* nests. Venom alkaloids were then extracted from soil using a filtration method. GC-FID was used for quantitative analysis of venom alkaloids, screening of the optimal extraction solvent, and determination of the optimal volume of triethylamine. The optimized method was used for quantitative analysis of venom alkaloids from the soil of ant nest.【Results】Among the five extraction solvents including *n*-hexane, dichloromethane, ethyl acetate, acetone and methanol, the recovery rate of alkaloids by *n*-hexane extraction was relatively higher. The best extraction efficiency was achieved by adding 1 mL or more triethylamine. Among the venom alkaloids in the soil of *S. invicta* nest, the content of *trans*-C15:1 was the highest, followed by that of *trans*-C13:

基金项目: 国家自然科学基金项目(31772540)

作者简介: 李晓玲, 女, 1994 年 8 月生, 湖北建始人, 硕士研究生, 研究方向为化学生态学研究, E-mail: 1002884319@qq.com

* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: chenli1@hbu.edu.cn; sg-fang@hotmail.com

收稿日期 Received: 2019-11-29; 接受日期 Accepted: 2020-02-17

1. The content of total alkaloids in *S. invicta* nest soil was about 22 μg/g. 【Conclusion】Triethylamine is very effective for extracting venom alkaloids from the soil of ant nests. The concentration of alkaloids in the soil of *S. invicta* nest is relatively high, which may have an important impact on the microbial community in the nest environment.

Key words: *Solenopsis invicta*; venom; nest soil; alkaloids; filtration method; recovery rate; GC-FID

红火蚁 *Solenopsis invicta* 是一种社会性昆虫，在土壤中建立巢穴，巢穴高度可达 30 ~ 40 cm（Vinson, 1997）。蚁后产卵、哺育幼虫、化蛹、羽化、贮存粮食及种群活动等行为均发生在地下巢穴中。蚁巢不仅保护蚁群不受入侵者的侵害，还提供了一个对蚁群生存至关重要的微气候调节系统（Hölldobler and Wilson, 1990）。蚂蚁的筑巢、觅食活动能造成土壤结构改变和养分积累，进而改变土壤的物理性质和营养状况（Lafleur *et al.*, 2005）。除了土壤的物理性质如渗透和滤出特性的改变（Green *et al.*, 1998），红火蚁的建巢活动还会改变土壤的化学性质，如元素富集（Herzog *et al.*, 1976）。蚁巢是蚂蚁活动的中心场所，蚁群活动也可以将自身的一些化学物质带入巢内土壤中：一方面红火蚁会主动将代谢产物排泄到蚁巢土壤中，另一方面红火蚁和土壤的频繁接触也会使体表化合物等次生代谢物被动地进入蚁巢土壤中。例如，Vander Meer 和 Lofgren（1988）在红火蚁巢穴土壤中发现了红火蚁表皮烃类化合物。

Chen 等（2009）利用正己烷浸提红火蚁工蚁，用 GC-MS 鉴定红火蚁毒液生物碱的主要成分是 2-甲基-6-烷基哌啶生物碱混合物：2-甲基-6-十三碳烯基-6-哌啶（C13∶1），2-甲基-6-十三烷基-6-哌啶（C13∶0），2-甲基-6-十五碳烯基-6-哌啶（C15∶1），2-甲基-6-十五烷基-6-哌啶（C15∶0），2-甲基-6-十七碳烯基-6-哌啶（C17∶1）以及 2-甲基-6-十七烷基-6-哌啶（C17∶0）。一头红火蚁工蚁的毒囊中含有约 10 ~ 15 μg的毒液，所以每个蚁巢都拥有大量的毒液生物碱（Storey *et al.*, 1991）。红火蚁利用毒液进行防御和杀死猎物（Vander Meer *et al.*, 1980）。红火蚁极具攻击性，一旦不小心触碰其巢穴，就会有大批红火蚁出来进行攻击。在攻击过程中，红火蚁会释放出大量的毒液，每头工蚁每次通过毒针释放大约 0.66 nL毒液，约占其毒液总含量的 3.1%（Haight and Tschinkel, 2003）。红火蚁栖息于真菌、细菌等微生物较丰富的巢穴环境中（Torsvik and Ovreas, 2002），易受多种真菌和细菌性病原体的侵染（Allen and Buren, 1974; Evans, 1982）。为了抵御病原菌浸染，红火蚁和其他社会性昆虫一样，会在 24 h 内将包括蚂蚁尸体在内的杂物清除出巢穴（Wilson, 1971）。这样感染真菌的尸体在产孢前被清除，就能有效地阻止分生孢子在蚁巢内的传播。在实验室给红火蚁种群接种白僵菌后，工蚁会在真菌孢子形成之前将蚂蚁尸体集中到蚁巢的一个角落（Storey *et al.*, 1991）。并且工蚁还用沙子覆盖尸体，从而限制了分生孢子的扩散。除了行为反应外，红火蚁还会产生具有显著抗菌活性的毒液生物碱（Blum *et al.*, 1958; Jouvenaz *et al.*, 1972; Blum, 1988）。红火蚁会在巢穴内表面分泌毒液生物碱，对其生活环境和幼虫体表等进行消毒（Obin and Vander Meer, 1985）；通过腹部快速振动向入侵者喷射毒液滴（Obin and Vander Meer, 1985; Storey *et al.*, 1991）。所以蚁巢土壤和蚂蚁身上可能存在高浓度的生物碱，并发挥抗菌、抑菌作用。

关于土壤中生物碱类化合物提取方法的研究比较多，比如用四氢呋喃∶水∶乙腈∶乙酸（50∶30∶20∶1, v/v）混合溶剂提取土壤中的 α-茄碱（Jensen *et al.*, 2007）；用正己烷∶丙酮（3∶1, v/v）混合溶剂提取土壤中的咔唑类污染物（Mumbo *et al.*, 2015）；用含硫酸镁和氯化钠的乙腈提取土壤中的阿托品和莨菪碱（Both *et al.*, 2017）；用甲醇∶甲醇（85∶15, v/v）分步提取土壤中的吡咯西啶类生物碱（Hama and Strobel, 2019）；用 1.5 mol/L 氢氧化钠溶液碱化土壤后，接着用氯化正丁酯提取土壤中的马钱子碱（Starr *et al.*, 1995, 1996）；先用1 mol/L 氢氧化钠溶液调整乙醇的 pH 值到 8 ~ 9，再用碱性乙醇提取土壤中的苦参碱（郝佳等, 2016）等。土壤 pH 值影响土壤对生物碱的吸附能力，比如随着土壤 pH 值升高，吸附马钱子碱的能力增强（Kookana *et al.*, 1997）。红火蚁毒液呈弱碱性，而我国南方土壤主要呈酸性（杨志元, 2016），毒液生物碱与土壤中的酸性物质结合形成不溶于有机溶剂的盐，致使无法直接用有机溶剂提取土壤中的生物碱。三乙胺的碱性强于毒液生物碱，可优先与酸性物质反应。利用三乙胺排除酸性物质的影响后，就可以用有机溶剂提取红火蚁巢穴土中的毒液生物碱。

本研究探讨红火蚁巢穴土壤中的毒液生物碱的提取方法,测定红火蚁蚁巢毒液生物碱的含量,研究结果将有助于后期从微生境角度分析红火蚁入侵对土壤生态环境的影响,揭示入侵物种对新入侵地土壤微环境的适应机制等方面的工作。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 土壤样品:采自广州市华南农业大学东校区附近草坪和广州市黄浦区葡萄园附近草坪的红火蚁蚁巢的土壤。蚁巢土壤采集方法:随机选取 4 个红火蚁蚁巢(各蚁巢之间相距至少 5 m),分别挖取蚁巢深度约 15 cm 处的土壤各约 200 g,放置在蚁巢附近,待蚂蚁爬回蚁巢,土壤样品自然风干后,带回实验室。在制样板上碾压土壤颗粒,过 2 mm 孔径筛,得到直径 <2 mm 的蚁巢土壤样品,用自封袋封装,备注详细采集信息后,保存于 4℃ 冰箱中。按上述方法采集蚁巢周边 3 m 处的土壤作为空白对照,并用于毒液添加回收实验。

1.1.2 主要仪器:万分之一电子天平(AR224CN)、隔膜真空泵(N820.3FT.18)、旋转蒸发仪(R-3HB)、美国安捷伦公司 Agilent Technologies 气相色谱仪 7890A(GC)、7890A-5975C 气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)、超声震荡仪(KQ-100E)。

1.1.3 主要试剂:HPLC 级正己烷(上海安谱实验科技股份有限公司)、二氯甲烷、乙酸乙酯、丙酮、甲醇、三乙胺(均为分析纯,北京市通广精细化工公司)。

1.2 红火蚁毒液生物碱的获取和添加毒液生物碱的土壤样品的制备

称取 5.0 g 红火蚁工蚁冷冻于 −20℃ 冰箱,1 h 后取出,用 20 mL 正己烷浸泡 48 h,取出浸提液,加适量无水硫酸钠干燥 12 h 后,用氮气浓缩至 5 mL,用硅胶柱层析法分离生物碱(Chen and Fadamiro, 2009)。柱层析分离所收集的流分用 Agilent 7890A 气相色谱仪进行成分分析,最后将收集到的生物碱流分合并,浓缩抽干洗脱溶剂即得红火蚁毒液生物碱样品。用毛细管取极少量毒液生物碱,用正己烷溶解后进行 GC-FID 分析,以检测其纯度。称取 2.0 g 蚁巢周边土壤样品于 16 mL 玻璃样品瓶中,加入 40 μL 红火蚁毒液生物碱样品,震荡混匀,使毒液与土壤充分混匀,即完成添加毒液生物碱的土壤样品制备。

1.3 GC-FID 和 GC-MS 分析

GC-FID 分析:检测器:FID(火焰离子化检测器);色谱柱:HP-5MS 毛细管柱,规格 30 m × 0.32 mm × 0.25 μm;进样量:2 μL,无分流进样;进样口温度 270 ℃,检测器温度 280℃。柱温箱升温程序:起始温度 50℃,保持 1 min,以 5℃/min 的速率升至 100℃,保持 0 min,然后以 10℃/min 升至 240℃,保持 10 min。

GC-MS 分析:参照 Liu 等(2017)利用 GC-MS 鉴定红火蚁毒液生物碱和土壤样品中的生物碱。GC-MS 的色谱柱、柱温箱升温程序和进样条件同 GC-FID 分析。MS 的电离方式为 EI,电离能量为 70 eV,离子源温度为 230℃,质量扫描范围 50 ~ 500 amu。载气为氦气,流速为 1 mL/min。

1.4 土壤样品中生物碱提取方法的优化

1.4.1 毒液生物碱抽滤提取法:将加入提取溶剂的待测样品常温下浸提 8 h 后,超声震荡 15 min;将超声后的样品用真空泵抽滤得到第 1 次回收提取液 A;将滤渣再次加入等量的溶剂按上述方法提取,并重复 3 次,依次得到第 2 次回收提取液 B,第 3 次回收提取液 C,第 4 次回收提取液 D;将上述 4 种提取液分别用旋转蒸发仪浓缩至近干,加入色谱级正己烷定容至 1 mL,并过 0.45 μm 有机滤膜至 1.5 mL 样品瓶中,用于 GC-FID 分析。

1.4.2 提取溶剂筛选:选择以下 5 种极性不同的溶剂进行比较,正己烷、二氯甲烷、乙酸乙酯、丙酮和甲醇。取 4 mL 溶剂加入到 1.2 节中的土壤样品中,同时分别向样品中添加 1 mL 三乙胺,利用 1.4.1 节方法抽滤提取样品中的毒液生物碱。计算不同溶剂处理的毒液总生物碱的回收率,筛选最佳提取溶剂。每种溶剂处理设 4 个重复。

1.4.3 三乙胺添加方法:取 4 mL 正己烷加入到 1.2 节中的土壤样品中,同时分别向样品中添加 0.125, 0.25, 0.5, 1 和 2 mL 三乙胺,利用 1.4.1 节方法抽滤提取样品中的毒液生物碱。以合成的顺式 2-甲基-6-十一烷基哌啶(*cis*-C11)为标准品用外标法(黄敏兴等, 2019)定量计算土壤样品中的生物碱含量。计算不同体积的三乙胺处理的毒液生物碱的回收率,筛选出三乙胺的最佳添加体积。实验重复 4 次。

1.5 红火蚁蚁巢土生物碱测定方法

称取 10.0 g 蚁巢土壤样品于 50 mL 离心管中,加入 20 mL 正己烷和 5 mL 三乙胺,采用 1.4.1 节中提取方法提取毒液生物碱,用于 GC-FID 分析。用

外标法进行定量生物碱含量。用合成的 *cis*-C11 作为标准品,稀释成 3.125 ~ 400 ng/μL 共 8 个浓度,制作标准曲线。标准品的浓度(X)与色谱峰面积(Y)通过线性回归分析建立标准曲线。利用标准曲线计算出土壤样品中的生物碱浓度。每个蚁巢土壤样品重复 4 次。

1.6　数据分析

采用 Microsoft Excel 2007 及 SPSS 20.0 进行数据分析,并进行 One-way ANOVA 统计分析,以 Tukey 氏 HSD 进行显著水平检测。

2　结果

2.1　生物碱标准曲线和红火蚁工蚁毒液生物碱成分鉴定

基于生物碱标准品浓度(X)与色谱峰面积(Y)实验数据,通过线性回归建立的生物碱标准曲线为 $Y = 11.476X + 8.6009$, $R^2 = 0.9999$ (图1),说明


3.125 ~ 400 ng/μL 的浓度范围内线性关系非常好。

红火蚁工蚁体内毒液生物碱提取的气相色谱图显示(图2),红火蚁工蚁毒液生物碱的主要成分为 *trans*-C13∶1 (峰 2)、*trans*-C13 (峰 3)、*trans*-C15∶1 (峰4)和 *trans*-C15 (峰 5),次要成分为 *trans*-C11 (峰 1)。选取其中 4 种主要成分用于定量分析。

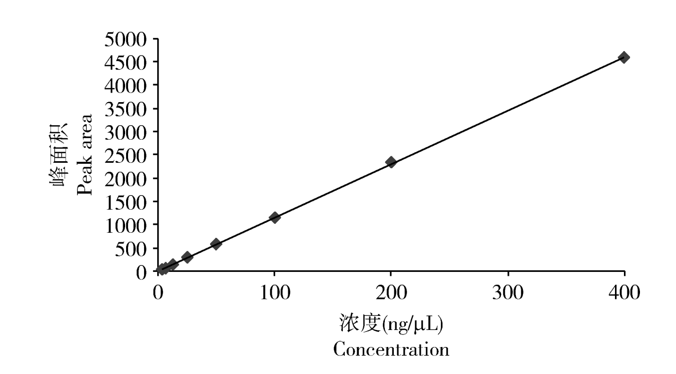


图 1　*cis*-C11 标准曲线

Fig. 1　The standard curve of *cis*-C11

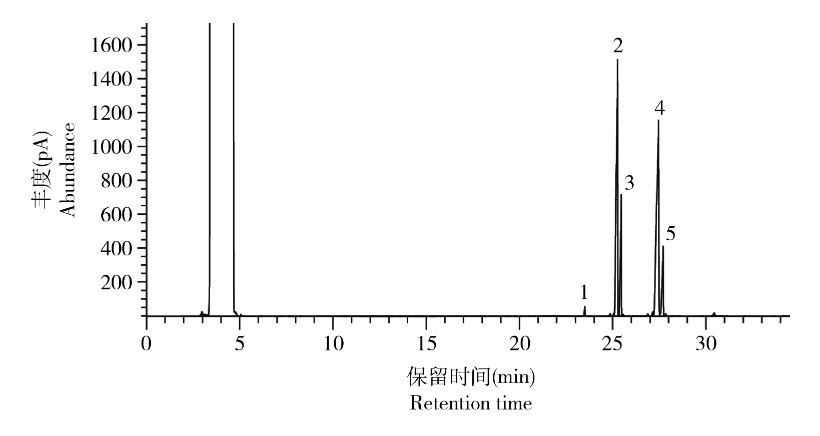


图 2　红火蚁工蚁毒液生物碱气相色谱图

Fig. 2　Gas chromatogram of venom alkaloids of workers of *Solenopsis invicta*

1：*trans*-C11；2：*trans*-C13∶1；3：*trans*-C13；4：*trans*-C15∶1；5：*trans*-C15.

2.2　生物碱提取方法优化

2.2.1　不同有机溶剂对土壤毒液生物碱的提取效率:正己烷、二氯甲烷、乙酸乙酯、丙酮、甲醇等 5 种不同极性的有机溶剂作为提取溶剂,并添加 1 mL 三乙胺到土壤样品中,采用抽滤法提取毒液生物碱。正己烷的提取效率最高,生物碱的回收率为 65.50% ± 3.55%;丙酮的提取效率最低,生物碱的回收率为 49.73% ± 3.32%;但不同溶剂处理生物碱回收率在 0.05 水平上无显著性差异($F_{4,15} = 1.407$, $P = 0.279$)(图 3)。

2.2.2　三乙胺的添加量对土壤毒液生物碱的提取回收率的影响:选取正己烷作为提取溶剂,4 种毒液生物碱的第 1 次提取回收率随着三乙胺添加量的增加而提高。当加入三乙胺的量为 1 mL 时,4 种生物碱的提取回收率达到最大,继续增加三乙胺的添加量到 2 mL,提取回收率无显著性变化($P > 0.05$)(图 4：A)。

将 4 次提取所得的提取回收率相加,得到总提取回收率。*trans*-C13∶1, *trans*-C13 和 *trans*-C15∶1这 3 种生物碱的总提取回收率没有随着三乙胺添加量的增加而发生显著变化,它们的总提取回收率都集中在 55% ~ 70% 之间。*trans*-C15 的总提取回收率在 0.125 mL 时最低,约为 52%;而当三乙胺的添加量为 0.25 mL 及以上时,总提取回收率达到 95% ~ 120% 之间(图 4：B)。

将 4 种生物碱的含量相加,得到总生物碱的含

量。总生物碱的第 1 次提取回收率随三乙胺量的增加而增加。当三乙胺为 1 mL 时,总生物碱第一次提取回收率均可达 62% ~69%。因此可以选取 4 mL 正己烷 +1 mL 三乙胺来提取 2 g 土壤中的毒液生物碱,且只需要进行 1 ~2 次提取即可提取到大部分生物碱(表 1)。

2.3 蚁巢土壤中生物碱含量

红火蚁蚁巢生物碱种类主要为 *trans*-C13:1, *trans*-C13, *trans*-C15:1 和 *trans*-C15。在 4 巢土样中,*trans*-C15:1含量显著高于其他 3 种生物碱($P<0.05$),含量为 10.13 ±0.51 μg/g; *trans*-C13:1的含量次之,为 6.24 ±0.33 μg/g; *trans*-C13 和 *trans*-C15 含量最低,分别为 3.06 ± 0.20 μg/g 和 2.85 ± 0.36 μg/g,两者之间没有显著差异($P>0.05$)(图 5)。蚁巢土壤中的总生物碱含量为 22.28 ± 1.13 μg/g。

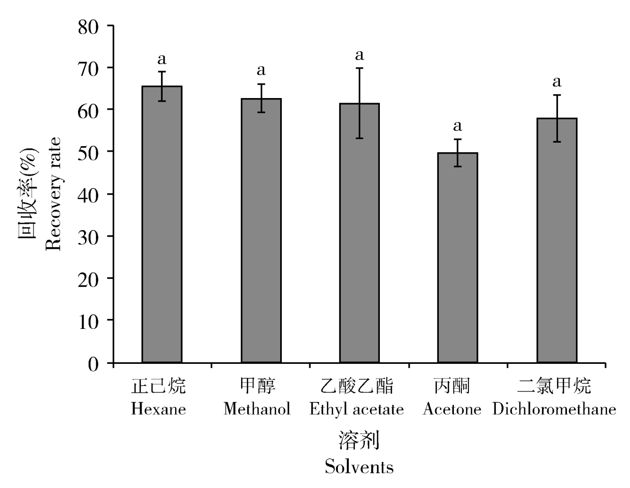


图 3 不同溶剂对总生物碱回收率的影响

Fig. 3 Effect of different solvents on recovery rate of alkaloids

图中数据为平均值 ± 标准误,柱上不同小写字母表示差异显著($P<0.05$, Tukey 氏 HSD 检验);图 4 和 5 同。Data in the figure are mean ± *SE*. Different lowercase letters above bars indicate significant difference ($P<0.05$, Tukey's HSD test). The same for Figs. 4 and 5.

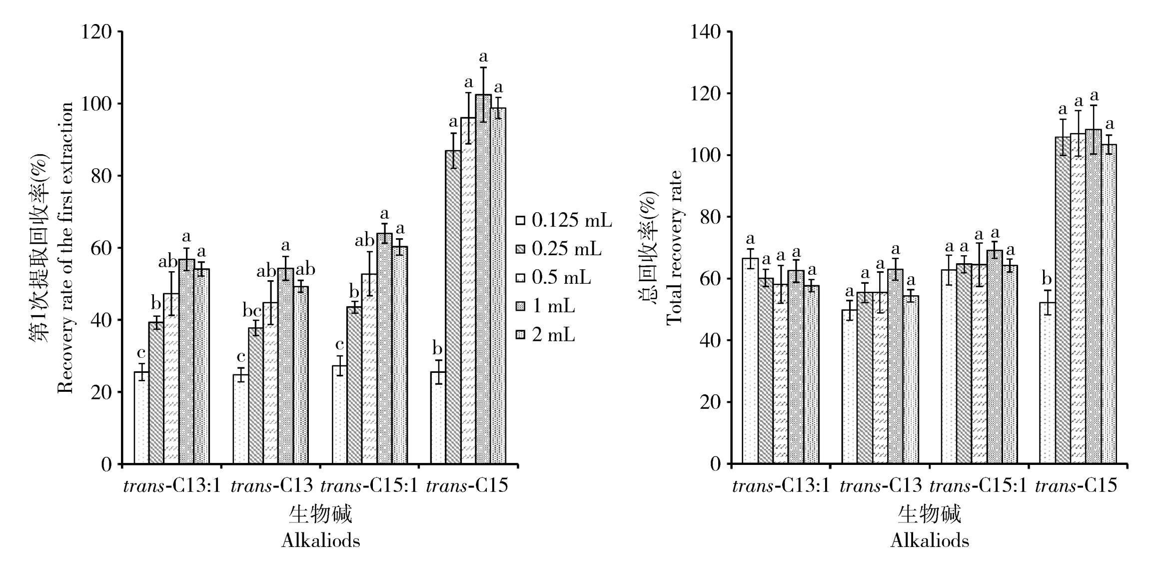


图 4 三乙胺添加量对 4 种生物碱第 1 次提取回收率(A)和总回收率(B)的影响

Fig. 4 Effect of additive amount of triethylamine on the recovery rate of the first extraction (A) and total recovery rate (B) of four alkaloids

表 1 4 次三乙胺抽滤提取的总生物碱回收率(%)

Table 1 Recovery rate (%) of total alkaloids with four triethylamine extractions

三乙胺添加量(mL) Additive amount of triethylamine	第 1 次回收率 1st recovery rate	第 2 次回收率 2nd recovery rate	第 3 次回收率 3rd recovery rate	第 4 次回收率 4th recovery rate	总回收率 Total recovery rate
0.125	28.10 ±4.31 c	18.03 ±1.70 a	6.13 ±0.46 a	2.38 ±0.13 a	54.64 ±5.85 a
0.25	47.45 ±2.18 b	15.11 ±1.30 a	2.71 ±0.20 b	0.83 ±0.14 b	66.10 ±3.12 a
0.5	56.06 ±6.21 ab	9.50 ±0.68 b	1.04 ±0.06 c	0.32 ±0.04 c	66.92 ±6.78 a
1	65.78 ±3.57 a	4.60 ±0.16 c	0.52 ±0.10 c	0.52 ±0.18 bc	71.51 ±3.83 a
2	60.75 ±2.91 ab	3.13 ±0.48 c	0.36 ±0.04 c	0.37 ±0.03 bc	64.61 ±2.67 a

表中数据为平均值 ± 标准误;同列数据后不同小写字母分别表示差异显著($P<0.05$, Tukey 氏 HSD 检验)。Data in the table are mean ± *SE*. Different lowercase letters following the data in the same column indicate significant differences ($P<0.05$, Tukey's HSD test).

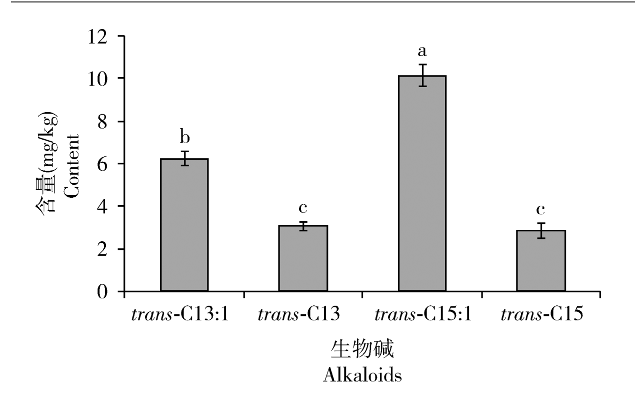


图 5　红火蚁巢穴土壤中 4 种主要生物碱的含量

Fig. 5　Contents of four major alkaloids in the soil of *Solenopsis invicta* nest

3　讨论

生物碱的提取方法主要有超声提取法、双水相萃取法、加速溶剂提取法、半仿生提取法等(张林等, 2017)。我国南方土壤主要呈酸性,而红火蚁毒液生物碱的主要成分呈弱碱性。在添加回收实验时,由于添加的毒液生物碱可能与土壤中的腐殖酸等酸性物质结合,生成不易溶于有机溶剂的盐,导致生物碱提取效率低甚至提取不出来,因此需要在提取溶剂中加入三乙胺。三乙胺的碱性强于毒液生物碱,可以优先与土壤中的酸性物质反应,使土壤中的毒液生物碱呈游离态,很容易用有机溶剂提取出来。我们在比较 4 次提取的回收率时发现,第 1 次提取回收率随着三乙胺添加量的增加而提高;当三乙胺的添加量达到 1 mL 时,通过 1 次提取就可回收大多数的生物碱。因此,当三乙胺与有机溶剂体积比为 1∶4时,通过 1 ~ 2 次提取即可提取到土壤中的大部分生物碱。正己烷、二氯甲烷、乙酸乙酯、丙酮、甲醇等 5 种不同极性的有机溶剂作为提取溶剂时,提取效果相差不大,说明这 5 种溶剂都可以用作提取巢穴土壤中生物碱的提取溶剂。但是,丙酮和甲醇的极性、溶解性都比较强,导致土壤中的其他杂质的提取率也比较高,不利于生物碱成分的纯化,而且用丙酮作为溶剂易产生乳化现象。

本研究结果表明,在红火蚁巢穴土壤中,毒液生物碱 *trans*-C13∶1和 *trans*-C15∶1的含量显著高于其他两种生物碱,4 次提取实验测得的总生物碱含量大概为 22 μg/g;因添加回收实验所得的总生物碱的回收率最高为 71.51%,所以蚁巢土壤中总生物碱含量理论值大概为 31 μg/g。在采集巢穴土壤样品过程中,不可避免地破坏蚁巢,引起大量工蚁的防御反应,有些工蚁可能会释放毒液到土壤中,使得所测巢穴土壤生物碱含量要高于实际含量。所以综合提取效率和工蚁防御反应这两方面的影响,我们测定的蚁巢土壤生物碱含量可能非常接近其真实值。

红火蚁生物碱具有广泛的杀菌活性,稀释 50 倍的生物碱能有效地抑制化脓性微球菌 *Micrococcus pyogenes*、化脓性链球菌 *Streptococcus pyogenes*、大肠杆菌 *Escherichia coli*、干酪乳杆菌 *Lactobacillus casei* 等多种真菌(Blum *et al*., 1958)。从红火蚁毒液分离出的哌啶和脱氢哌啶类生物碱对终极腐霉 *Pythium ultimum* 的菌丝生长有明显的抑制作用,也能抑制其孢子囊的萌发,其中哌啶生物碱的抑菌 EC_{50}为 17.0 μg/mL,抑制孢子萌发 EC_{50}为 12.3 μg/mL (Li *et al*., 2012)。毒液中的哌啶和脱氢哌啶类生物碱还能抑制番茄细菌性溃疡病菌 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* 的生长,其中哌啶生物碱的抑菌 EC_{50} 为 31.5 μg/mL,且在 75.3 μg/mL 的浓度下对该菌有完全抑制作用(Li *et al*., 2013)。合成的哌啶生物碱成分在低浓度下具有抑制多种细菌生长的能力(Urbani and Kannowsk, 1974);对金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 的杀菌浓度为 4 ~ 12 μg/mL,对大肠杆菌 *E. coli* 的杀菌浓度为 20 ~ 40 μg/mL (Jouvenaz *et al*., 1972)。合成的脱氢哌啶生物碱成分 2-甲基-6-十八烷基-$\Delta^{1,6}$-哌啶具有体外抗真菌活性,对新生隐球菌 *Cryptococcus neoforman* 的最低抑制浓度为 6.6 μg/mL,对白色念珠菌 *Candida albicans* 的最低抑制浓度为 12.4 μg/mL(Yan *et al*., 2017)。很显然,所测得的蚁巢土壤生物碱含量在抑菌活性浓度范围内。

蚂蚁对土壤微生物群落的影响及蚂蚁与真菌间的关系已成为社会昆虫学家、生态学家的研究热点。蚂蚁巢穴内微生物多样性的研究均显示,蚁巢土壤微生物的丰富度及多样性均高于巢外对照土壤(Dauber and Wolters, 2000; Zettler *et al*., 2002; Boulton *et al*., 2003; Baird *et al*., 2007)。红火蚁巢穴中的毒液生物碱可能会参与调节蚁巢土壤微生物的丰富度和多样性水平。巢穴土壤中的微生物体系具有重要的化学转化作用,反过来又影响蚂蚁的种群活动。所以可以断言,红火蚁巢穴土壤中的毒液生物碱对红火蚁在新的生境中的定殖和入侵有重要的促进作用。

参考文献(References)

Allen GE, Buren WF, 1974. Microsporidan and fungal diseases of

Solenopsis invicta Buren in Brazil. *J. New York Entomol. Soc.*, 82(2): 125-130.

Baird R, Woolfolk S, Watson CE, 2007. Survey of bacterial and fungal associates of black/hybrid imported fire ants from mounds in Mississippi. *Southeast. Nat.*, 6(4): 615-632.

Blum MS, 1988. Biocidal and deterrent activities of nitrogen heterocycles produced by venomous myrmicine ants. *ACS Symp. Ser.*, 380: 438-449.

Blum MS, Walker JR, Callahan PS, Novak AF, 1958. Chemical, insecticidal, and antibiotic properties of fire ant venom. *Science*, 128(3319): 306-307.

Both EB, Moreno-González D, García-Reyes JF, Dernovics M, 2017. Monitoring the degradation of atropine and scopolamine in soil after spiking with naturally contaminated organic millet. *Sci. Total Environ.*, 625(2018): 1088-1092.

Boulton AM, Jaffee BA, Scow KM, 2003. Effects of a common harvester ant (*Messor andrei*) on richness and abundance of soil biota. *Appl. Soil Ecol.*, 23(3): 257-265.

Chen J, Cantrell CL, Shang H, Rojas MG, 2009. Piperideine alkaloids from the poison gland of the red imported fire ant (Hymenoptera: Formicidae). *J. Agric. Food Chem.*, 57(8): 3128-3133.

Chen L, Fadamiro HY, 2009. Re-investigation of venom chemistry in *Solenopsis* fire ants. II. Identification of novel alkaloids in *S. invicta*. *Toxicon*, 53(5): 479-486.

Dauber J, Wolters V, 2000. Microbial activity and functional diversity in the mounds of three different ant species. *Soil Biol. Biochem.*, 32(1): 93-99.

Evans HC, 1982. Entomogenous fungi in tropical forest ecosystems: an appraisal. *Ecol. Entomol.*, 7(1): 47-60.

Green WP, Pettry DE, Switzer RE, 1998. Impact of imported fire ants on the texture and fertility of Mississippi soils. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 29(3-4): 447-457.

Haight KL, Tschinkel WR, 2003. Patterns of venom synthesis and use in the fire ant, *Solenopsis invicta*. *Toxicon*, 42(6): 673-682.

Hama JR, Strobel BW, 2019. Pyrrolizidine alkaloids quantified in soil and water using UPLC-MS/MS. *RSC Adv.*, 52(9): 30350-30357.

Hao J, Wu ZF, Qiu XP, Yao M, Ma ZQ, Zhang X, 2016. Determination and study on residue and dissipation of matrine in *Brassica rapa* L. *chinensis* Group. and soil by high performance liquid chromatography. *Chin. J. Pestic. Sci.*, 18(3): 367-372. [郝佳, 吴志凤, 邱晓鹏, 姚满, 马志卿, 张兴, 2016. 高效液相色谱法检测苦参碱在小白菜及土壤中的残留与消解动态. 农药学学报, 18(3): 367-372]

Herzog DC, Reagan TE, Sheppard DC, Hyde KM, Nilakhe SS, Hussein MYB, McMahan ML, Thomas RC, Newsom LD, 1976. *Solenopsis invicta* Buren: influence on louisiana pasture soil chemistry. *Environ. Entomol.*, 5(1): 160-162.

Hölldobler B, Wilson EO, 1990. The Ants. The Belknap Press and Harvard University Press, Cambridge, MA.

Huang MX, Zhen ZP, Gao YF, Li SC, Wang XP, Pang YH, Yu GB, 2019. Determination of 15 herbicides in sugarbeet by QuEChERS-UPLC-MS/MS. *Agrochemicals*, 58(8): 594-597. [黄敏兴, 甄振鹏, 高裕锋, 李硕聪, 王小鹏, 庞扬海, 余构彬, 2019. QuEChERS-超高效液相色谱串联质谱法测定甜菜中15种除草剂. 农药, 58(8): 594-597]

Jensen PH, Harder BJ, Strobel BW, Bo S, Hansen HCB, 2007. Extraction and determination of the potato glycoalkaloid α-solanine in soil. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 87(12): 813-824.

Jouvenaz DP, Blum MS, MacConnell JG, 1972. Antibacterial activity of venom alkaloids from imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2(4): 291-293.

Kookana RS, Rogers SL, Oliver DP, 1997. Sorption and desorption behaviour of strychnine rodenticide in soils. *Aust. J. Soil Res.*, 35: 491-502.

Lafleur B, Hooper-Bùi LM, Mumma EP, Geaghan JP, 2005. Soil fertility and plant growth in soils from pine forests and plantations: effect of invasive red imported fire ants *Solenopsis invicta* Buren. *Pedobiologia*, 49(5): 415-423.

Li S, Jin X, Chen J, 2012. Effects of piperidine and piperideine alkaloids from the venom of red imported fire ants, *Solenopsis invicta* Buren, on *Pythium ultimum* Trow growth *in vitro* and the application of piperideine alkaloids to control cucumber damping-off in the greenhouse. *Pest Manag. Sci.*, 68(12): 1546-1552.

Li SZ, Jin XX, Chen J, Lu SE, 2013. Inhibitory activities of venom alkaloids of red imported fire ant against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in vitro and the application of piperidine alkaloids to manage symptom development of bacterial canker on tomato in the greenhouse. *Int. J. Pest Manag.*, 59(2): 150-156.

Liu HW, Lu YY, Wang WK, Chen L, 2017. Whole body solvent soak gives representative venom alkaloid profile from *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae) workers. *Fla. Entomol.*, 100(3): 522-527.

Mumbo J, Henkelmann B, Abdelaziz A, Pfister G, Nguyen N, Schroll R, Munch JC, Schramm KW, 2015. Persistence and dioxin-like toxicity of carbazole and chlorocarbazoles in soil. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 22: 1344-1356.

Obin MS, Vander Meer RK, 1985. Gaster flagging by fire ants (*Solenopsis* spp.): functional significance of venom dispersal behavior. *J. Chem. Ecol.*, 11(12): 1757-1768.

Starr RI, Timm RW, Doxtader KG, Hurlbut DB, Volz SA, Goodall M, 1996. Sorption and aerobic biodegradation of strychnine alkaloid in various soil systems. *J. Agric. Food Chem.*, 44(6): 1603-1608.

Starr RI, Timm RW, Hurlbut DB, Volz SA, 1995. Aerobic biodegradation of strychnine alkaloid rodenticide in soil. *Int. Biodeter. Biodegr.*, 36(1-2): 103-124.

Storey GK, Vander Meer RK, Boucias DG, McCoy CW, 1991. Effect of fire ant (*Solenopsis invicta*) venom alkaloids on the in vitro germination and development of selected entomogenous fungi. *J. Invertebr. Pathol.*, 58(1): 88-95.

Torsvik V, Ovreas L, 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.*, 5(3): 240-245.

Urbani CB, Kannowsk PB, 1974. Patterns in red imported fire ant settlement of a Louisiana pasture some demographic parameters,

interspecific competition and food sharing. *Environ. Entomol.*, 3 (5): 755 – 760.

Vander Meer RK, Glancey BM, Lofgren CS, Glover A, Tumlinson JH, Rocca J, 1980. The poison sac of red imported fire ant queens: source of a pheromone attractant. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 73(5): 609 – 612.

Vander Meer RK, Lofgren CS, 1988. Use of chemical characters in defining populations of fire ants, *Solenopsis saevissima* complex, (Hymenoptera: Formicidae). *Fla. Entomol.*, 71(3): 323 – 332.

Vinson SB, 1997. Invasion of the red imported fire ant (Hymenoptera: Formicidae): spread, biology, and impact. *Am. Entomol.*, 43(1): 23 – 39.

Wilson EO, 1971. The Insect Societies. Harvard University Press, Cambridge, MA.

Yan YJ, An Y, Wang XZ, Chen YQ, Jacob MR, Tekwani BL, Dai LY, Li XC, 2017. Synthesis and antimicrobial evaluation of fire ant venom alkaloid based 2-methyl-6-alkyl-$\Delta^{1,6}$-piperideines. *J. Nat. Prod.*, 80(10): 2795 – 2798.

Yang ZY, 2016. Determination of pH value of vineyard soil and treatment of acid soil in the middle east of south China. *Fruit Trees South China*, 45(1): 121 – 122. [杨志元, 2016. 我国南方中东部地区葡萄园土壤 pH 值测定及酸性土壤矫治. 中国南方果树, 45(1): 121 – 122]

Zettler JA, McInnis TM, Allen CR, Spira TP, 2002. Biodiversity of fungi in red imported fire ant (Hymenoptera: Formicidae) mounds. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 95(4): 487 – 491.

Zhang L, Zhang CF, Xu XH, Zhang M, 2017. A review on the extraction and separation of alkaliods. *Asia-Pacific Trad. Med.*, 13(15): 49 – 50. [张林, 张朝凤, 许翔鸿, 张勉, 2017. 生物碱提取分离方法研究进展. 亚太传统医药, 13(15): 49 – 50]

（责任编辑：赵利辉）